



TITLE:

# 泌尿器科腫瘍学における分子研究 の展望：腎細胞癌の発癌・転移と MN/CA9

AUTHOR(S):

仲川, 嘉紀; 植村, 天受; 清水, 一宏; 趙, 順規; 吉川, 元  
祥; 平尾, 佳彦; 吉川, 和宏

---

CITATION:

仲川, 嘉紀 ...[et al]. 泌尿器科腫瘍学における分子研究の展望：腎細胞癌  
の発癌・転移とMN/CA9. 泌尿器科紀要 2001, 47(11): 809-814

ISSUE DATE:

2001-11

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/114641>

RIGHT:

## 泌尿器科腫瘍学における分子研究の展望： 腎細胞癌の発癌・転移と MN/CA9

奈良県立医科大学泌尿器科学教室（主任：平尾佳彦教授）

仲川 嘉紀，植村 天受，清水 一宏

趙 順規，吉川 元祥，平尾 佳彦

愛知医科大学病理学第2講座（主任：佐賀信介教授）

吉 川 和 宏

### THE ROLE OF MN/CA IX ANTIGEN IN CARCINOGENESIS AND METASTASIS OF RENAL CELL CARCINOMA

Yoshinori NAKAGAWA, Hirotugu UEMURA, Kazuhiro SHIMIZU,  
Masaki CHO, Motoyoshi YOSHIKAWA and Yoshihiko HIRAO

*From the Department of Urology, Nara Medical University*

Kazuhiro YOSHIKAWA

*From the 2nd Department of Pathology, Aichi Medical University*

MN/CA IX is a carbonic anhydrase (CA) isoenzyme expressed in normal alimentary tract in a tissue-specific manner. This antigen is activated in the majority of renal cell carcinomas (RCC) but not in normal kidney tissues. Although the exact role of CA activity in carcinogenesis and metastasis has not been established, MN/CA9 has been suggested to be implicated in acidification of extracellular milieu surrounding the cancer cells and thus create a microenvironment conducive to tumor growth and spread. Mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) gene cause the familial syndrome and are also found in the majority of sporadic RCC. Wild-type VHL was recently described to down-regulate MN/CA9 in RCC cell lines, and the molecular mechanism of MN/CA9 and VHL in renal carcinogenesis is of interest. To investigate the mechanism of MN/CA9 activation in RCC, we examined the methylation status of this gene in RCC cell lines and human tissue samples and found that hypomethylation in the promoter region may play an important role in the expression of MN/CA9. RT-PCR analysis of blood samples from RCC patients revealed the presence of circulating MN-positive cells in the blood. This antigen may be a potential therapeutic target as well as diagnostic marker for RCC. Therefore, we are currently investigating whether or not MN/CA IX peptide could be an appropriate molecule for use antigen specific immunotherapy on RCC patients.

(Acta Urol. Jpn. 47: 809-814, 2001)

**Key words:** Renal cell carcinoma, MN/CA9, Carcinogenesis, Metastasis

### 緒 言

腎細胞癌は、有効な化学療法がなく、放射線感受性も低いことより、外科的手術療法が唯一有効な治療法であるといっても過言ではない。近年の画像診断技術の発達により、早期発見される症例が増えたことで治療成績の向上が認められるが、有転移症例や再発症例の予後はきわめて悪いのが現状である。また、腎細胞癌には rapid growth 症例や10年以上経過して再発転移する long dormancy 症例など、特異な生物学的特性がある。このように限られた治療法しかなく、その増殖・転移に特異な特性がある腎細胞癌において、発癌・転移機構の解明や新たな治療法の確立は重要な課

題と考えられる。

MN/CA9 は、1994年に Pastorek らが子宮癌細胞株 Hela を target として作成された抗体 M75 の認識する抗原を同定し、そのアミノ酸配列の類似性より炭酸脱水酵素 carbonic anhydrase (CA) のファミリーに含まれるものとして命名した糖蛋白である<sup>1)</sup> MN/CA9 抗原は細胞膜と核に存在する 54 kD の糖蛋白で、cDNA は11の exon より構成され<sup>2)</sup>、その遺伝子は第9染色体短腕 (9p12-13) に存在する<sup>3)</sup> またこの抗原は Oosterwijk らによって1986年に作製されたマウスモノクローナル抗体 G250 (mAbG250) が認識する抗原そのものであり、腎細胞癌において高率に発現している<sup>4)</sup> われわれが、mAbG250 を用いて免

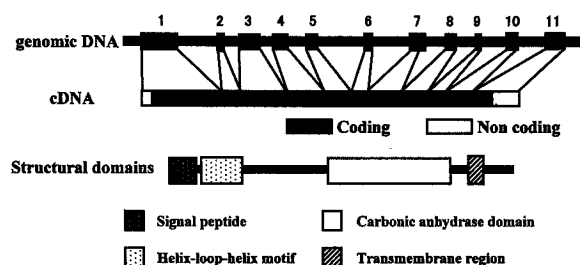


Fig. 1. Schematic representation of the MN/CA9 gene and structural domains.

疫組織染色により検討した結果では、腎細胞癌手術標本147例中128例87.1%において MN/CA9 の発現が確認され、clear cell type では96例中95例99.0%において発現を認められた<sup>5)</sup>

腎細胞癌以外では、MN/CA9 蛋白は子宮頸癌、食道癌、大腸癌、肺癌などにおいて高率に発現を認めている<sup>7)</sup> 正常組織では腎組織を含め発現を認めない組織は多いが、胆管、胃、小腸の上皮などは発現を認める<sup>4,6,7)</sup>

このような発現の分布の特異性から、MN/CA9 は腎細胞癌の発癌や転移の機構を考える上で重要な蛋白であり、その診断や治療において有効な標的分子になりえると考えられる。今回、われわれは腎細胞癌における MN/CA9 発現の意義について検討を加えると共に、その臨床応用への試みについても概説する。

### 腎細胞癌発癌への MN/CA9 の関与

#### 1. MN/CA9 の発現と promoter 領域の脱メチル化

多くの組織特異的遺伝子の発現調節に、promoter 領域の DNA メチル化が関与していることが示されている。癌においてはメチル化による Rb, VHL などの癌抑制遺伝子の不活性化、脱メチル化による *myc*, MEGA-1 などの癌遺伝子の活性化が報告されている。われわれは MN/CA9 が組織特異的遺伝子であることに着目し、MN/CA9 遺伝子発現と DNA メチル化との関係について、promoter 領域の検討を行った。

MN/CA9 転写開始点より上流には TATA box や

CpG island はなく、AP1, AP2 や p53 などの転写因子が存在している<sup>2)</sup>。この領域に promoter 活性があるといわれており、転写開始点より上下流約 160bp 間に存在する6カ所の CpG site について bisulfite genomic sequencing protocol 法を用いてメチル化状態を調べた。

細胞株においては、MN/CA9 の発現していない SKRC-12, 14およびコントロール3サンプルでは、6カ所すべての CpG site がメチル化状態であった。一方 MN 陽性細胞株においては SKRC-1, 10, 44の3株で6カ所すべての CpG site が非メチル化状態であり、他の2株 (SKRC-6, 59) では半分以上の CpG site が非メチル化状態であった。次に、メチル化阻害剤 5-Aza-2'-Deoxycytidine 含有培養液にて MN 陰性腎細胞癌細胞株 SKRC-12 および -14 を7日間培養すると、いずれも MN/CA9 の発現が誘導され2~4個の CpG site で脱メチル化していることが認められた。以上より MN/CA9 の発現は 5' 領域の低メチル化と相関があると考えられた<sup>8)</sup>

さらに、6カ所のうち特定の CpG site の脱メチル化が重要な役割を担っていると考え、各 CpG site のメチル化と MN/CA9 の発現の関係について検討した。Cosmid library より MN/CA9 遺伝子 5' 領域 (-1246 pb から +42 bp) までも Subcloning 後、Luciferase reporter vector に導入し、Exo Mung beans 法を用いて種々の欠失変異体を作製した。MN 抗原陽性ヒト腎細胞癌培養細胞株 (SK-RC-44) に各欠失変異体を transfection し、Luciferase 活性を測定することで -158 bp から +42 bp までの promoter 領域があることを確認した。次に、promoter を含む各欠失変異体を CpG メチラーゼによりメチル化し、Luciferase 活性を測定したところ、-74 bp の CpG site の脱メチル化により MN/CA9 発現が惹起すると考えられ、さらにヒト腎細胞癌組織13例を用いた bisulfite genomic sequencing protocol 法での検討でも、-74 bp の CpG site の低メチル化が MN/CA9 発現腫瘍の90%において認められた。

#### 2. 癌抑制遺伝子 VHL と MN/CA9 発現

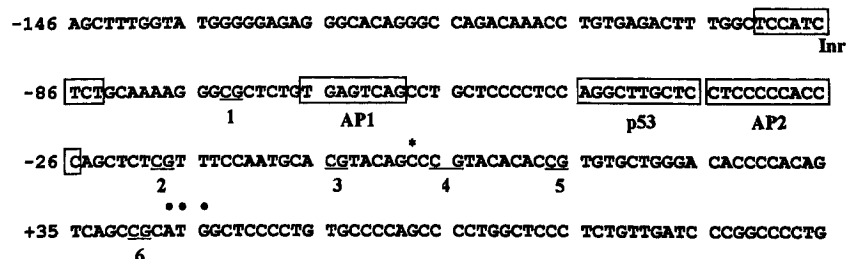


Fig. 2. The 5' region of the human MN/CA9 gene. Consensus sequences for initiator (Inr) and transcription factor (AP1, AP2, and p53) are surrounded with boxes. The asterisk indicates the transcription start site. Three dots indicate the translation start site.

Table 1. Methylation status of promoter region and expression of the MN/CA9 gene in human RCC cell lines

Samples	CpG sites (bp)						MN/CA9 expression
	-74	-19	-6	+4	+13	+40	
SK-RC-1	-	-	-	-	-	-	Yes
SK-RC-6	-	-	-	+	-	±	Yes
SK-RC-10	-	-	-	-	-	-	Yes
SK-RC-12	+	±	+	+	+	+	No
SK-RC-14	+	+	+	+	+	+	No
SK-RC-44	-	-	-	-	-	-	Yes
SK-RC-59	-	-	±	-	-	+	Yes
Normal 1	+	+	+	+	+	+	No
Normal 2	+	+	+	+	+	+	No
Normal 3	+	+	+	+	+	+	No

+: methylated, -: unmethylated, ±: partially methylated.

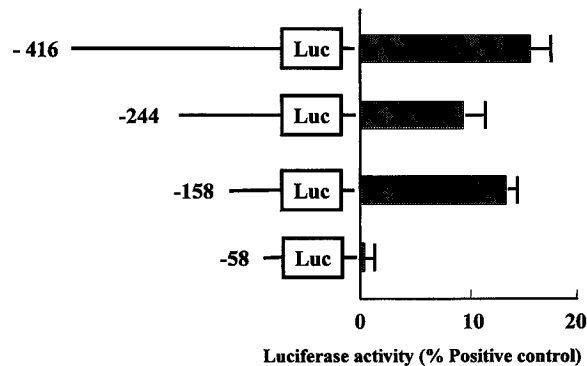


Fig. 3. Deletion analysis of the promoter region of MN/CA9 gene. Deletion constructs are identified by nucleotide numbers with respect to the transcription start. The activity of each deletion construct in transient transfection format is expressed as a percentage of the luciferase activity. Each of the bars represents the mean value  $\pm$  S.D. of the luciferase activity.

Table 2. Expression of MN/CA9 gene and frequency of hypomethylation in human renal cell carcinoma

	Frequency of hypomethylation at CpG sites (%)				
	-74	-6	+4	+13	+40
MN positive RCC (n=10)	90	20	40	40	0
MN negative RCC (n=3)	0	0	0	0	0
Normal kidney (n=3)	0	0	0	0	0

VHL 遺伝子は von Hippel-Lindau 病の原因となる癌抑制遺伝子であり, ヒト第3染色体短腕 (3p 25-26) より単離・同定された. 腎細胞癌の約80%を占める散発性の淡明細胞型腎細胞癌において, その50~60%に VHL 遺伝子の変異が, また約20%にメチル化による遺伝子の不活化が報告されるなど, 腎細胞

癌の発癌に関して重要な遺伝子である<sup>10)</sup> この VHL 蛋白 (pVHL) は elongin B, C や cul-2 などと複合体を形成し, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) に作用する酵素 proteasome を働かせて HIF を分解すると考えられている. この VHL 蛋白の機能に異常が生じると, HIF が増加し, そのことで vascular endothelial growth factor (VEGF) や glucose transporter 1 (GLUT-1) などの低酸素状態で誘導される蛋白群の発現が増加すると考えられている<sup>10)</sup>

最近の研究では腎細胞癌に高率に発現する MN/CA9 も, pVHL/HIF-1 機構により VEGF などと同様に発現すると考えられている<sup>11)</sup> MN/CA9 の発現は正常 VHL 遺伝子導入により抑えられるとの報告もあり<sup>12)</sup>, VHL 遺伝子異常と MN/CA9 発現には密接な関係が認められる. しかし, VHL 正常の glioblastoma においても MN/CA9 発現が認められることより, VHL 遺伝子異常がなくとも低酸素状態によって VHL 蛋白の機能が低下して, HIF-1 蛋白を強発現させることで MN/CA9 を発現させるのではないかと考えられている<sup>6)</sup> このことは clear cell type における VHL の遺伝子異常の頻度以上に MN/CA9 が発現していることや, VHL の遺伝子異常を伴わない granular cell type においても MN/CA9 が発現していることなどより, 腎細胞癌においても VHL 遺伝子異常を介さない MN/CA9 の発現機構が存在することが示唆される<sup>6)</sup> この様な VHL と MN/CA9 の関係についてさらに詳細に検討するために, われわれは数種の腎細胞癌細胞株において VHL の遺伝子異常と MN/CA9 の発現および正常 VHL 遺伝子導入による MN/CA9 の発現の変化について検討を行っている.

### 3. MN/CA9 蛋白の発現と発癌

発癌に関与する遺伝子には癌遺伝子と癌抑制遺伝子があり, 多段階的にそれらの遺伝子に変化が蓄積することが, 癌の発生ないし悪性化の原因となる. 腎細胞癌においては, VHL 遺伝子異常がよく知られており, その他では同じく第3染色体短腕 (3p 14.2) にある FHIT 遺伝子の LOH の頻度が高いことが報告されている<sup>13)</sup>が十分に解明されているとはいえない.

発癌における MN/CA9 の役割については, Hela 細胞では細胞密度が増加すると MN/CA9 の発現が高くなることや, MN/CA9 cDNA を線維芽細胞 NIH3T3 に遺伝子導入することより形質転換し細胞増殖を促進することなどの培養細胞での報告<sup>3)</sup>や, 大腸癌組織の細胞増殖の盛んな部位での MN/CA9 が高発現であること<sup>14)</sup>などより, MN/CA9 蛋白の細胞増殖への関与が示唆される. このことは, 低酸素状態で誘導される VEGF や GLUT-1 などの蛋白群と共に, MN/CA9 の発現が pVHL/HIF-1 機構によると考え

られることから推測され、さらに腎細胞癌の放射線療法や化学療法に対する抵抗性についても MN/CA9 蛋白発現の意義について興味深い点がある。

### 転移における MN/CA9 の役割

腎細胞癌の原発巣の診断は急速に進歩し、早期発見による治療効果は向上したものの、遠隔臓器への転移症例や再発症例の予後はほとんど変わっていない。したがって、転移機構の解明と、それに基づいた予防法や治療法の開発は、癌の克服に必要不可欠であると考えられる。転移巣の成立には細胞増殖、血管新生、宿主間質への浸潤、循環系への侵入、循環系内での生存、毛細血管内皮壁への付着、転移先臓器実質への侵入、局所での増殖ならびに血管新生などの、特異的な個々の連続したステップを完結する必要がある。すなわち、転移においても発癌機構と同様に多段階の遺伝子変化の蓄積が必要であり、決して単一の遺伝子の単離によりすべてが説明できるわけではない。

腎細胞癌の転移能に関与する因子として、増殖促進に関与する TGF $\alpha$ , EGF, bFGF, EGF レセプター、細胞接着分子としてカドヘリン、カテニン、CD44 などがあり、また細胞との接着分子であるインテグリン、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスとそれらの分解酵素である MMP-2, MMP-9 とその促進因子 (MT1-MMP)、阻害因子 (TIMP-2) がある。血管新生因子として VEGF, bFGF などがあり、癌関連遺伝子として nm23 遺伝子があげられる<sup>15)</sup>

このなかで MN/CA9 蛋白の転移における役割としては、細胞密度が増加すると発現が高くなることや、正常大腸粘膜の表層に少なく固有層よりの細胞に多く発現していることより、細胞増殖での細胞間調整に関与していることが示唆される<sup>1,7)</sup>とともに、細胞接着に関係しているとの報告<sup>16,17)</sup>や、腎細胞癌の浸潤に関係するとの報告<sup>18)</sup>もあり、MN/CA9 の発現が転移において重要な役割を果たしているものと推測されるが、その詳細はまだ明らかにはなっていない。

### MN/CA9 の臨床応用への試み

#### 1. 血液 marker としての MN/CA9

腎細胞癌においては現在のところ特異的な血液 marker は皆無で、早期診断や術後の monitoring には超音波検査やレントゲン検査などの画像診断に頼るしかないのが現状である。われわれは腎細胞癌に高率に発現している MN/CA9 抗原に着目し、RT-PCR 法による患者血液中の MN/CA9 抗原陽性細胞の検出により、早期診断や予後因子の血液 marker になり得ないか検討を行った。

まず、健康成人により採取した血液 10 ml に MN/CA9 陽性細胞を 0, 1, 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>

Table 3. Detection of circulating MN/CA IX positive cell

	MN+	MN-	Total
RCC	48 (63.2%)	28 (36.8%)	76
Normal	10 (32.3%)	21 (67.7%)	31

個を加えたサンプルで RT-PCR を行い感度について検討した。次に手術施行した腎細胞癌患者の組織標本は RT-PCR 法と mAbG250 による免疫組織染色により MN/CA9 の発現の有無を確認するとともに、血液中の MN/CA9 抗原陽性腎癌細胞の検出を試みた。また、健康成人より採取した血液をコントロールとして用いた<sup>19)</sup>

RT-PCR は血液 1 ml 中に 1 個の MN/CA9 陽性細胞を検出できた。MN/CA9 抗原陽性腎細胞癌患者 76 例中 48 例 63% に血液中 MN/CA9 陽性細胞が検出された。検出例について stage, grade の相関を検討したが、一定の傾向は認められなかった。次に、有転移症例 11 例中 9 例 82% に血中 MN/CA9 陽性細胞が検出され、術後経過観察中に転移の出現した 4 例中 3 例に MN/CA9 陽性細胞が検出された。以上より血液中の MN/CA9 陽性細胞の検出が、手術後の転移を予測する因子として有用であると考えられ、現在さらに症例数を増やして血液 marker としての有用性について検討を行っている。

#### 2. 治療における MN/CA9 の役割

1989年に初めて悪性黒色腫患者への遺伝子マーカー臨床研究、1990年には最初の遺伝子治療臨床研究が実施されて以来、世界中で数多くの遺伝子治療臨床研究が進められており、その多くは癌患者を必象としたものとなっている。腎細胞癌に対しても新たな治療法として、切除不能症例において遺伝子治療の検討が行われている。腎細胞癌に対する遺伝子治療臨床研究は、免疫遺伝子治療として自己癌細胞への遺伝子導入を行っているものが多く、本邦においても、GM-CSF 遺伝子を導入した自己癌細胞を用いた免疫遺伝子治療が試みられている。その効果と安全性については、現在研究が進められているが、その他の治療法として、われわれは腎細胞癌に高率に発現する MN/CA9 抗原の癌拒絶抗原として有用性に注目するとともに、その抗体 mAbG250 のリコンビナント抗体を作成することで免疫遺伝子治療に応用できないか検討を行っている。

##### 1) ペプチドワクチン

近年の基礎免疫学の進歩によって、1991年にメラノーマより CTL の標的となる抗原分子にコードする MAGE 遺伝子が同定され、癌拒絶抗原の存在と免疫排除機能の概念が確立された。これを契機として、ヒト悪性腫瘍特異抗原が種々同定され、悪性腫瘍の治療

を目的として癌特異抗原を用いた癌ワクチン療法の臨床試験が試みられるようになった。腎細胞癌に対する欧米でのワクチン療法の臨床応用は, IL-2 や interferon (IFN)- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  および GM-CSF などのサイトカインと自己癌細胞ワクチン, もしくは樹状細胞療法が主体である<sup>20)</sup> また, 腎細胞癌の癌拒絶抗原として, 食道扁平上皮癌細胞の cDNA より同定された SART-1<sup>21)</sup>, SART-3<sup>22)</sup> 抗原発現が報告され, 腎細胞癌のワクチン療法への可能性を示唆している。

われわれは腎細胞癌に高率に発現する MN/CA9 抗原の癌拒絶抗原として期待しており, 免疫療法の有効性について検討を行っている。

MN/CA9 遺伝子を, 発現ベクター BCMGSNeo を用いて BALB/c 由来のマウス腎癌細胞株 RenCa および線維芽細胞株 3T3 に遺伝子導入し, MN-RenCa 細胞株および MN-3T3 細胞株を樹立した。両細胞株が細胞表面に安定して MN/CA9 抗原と H-2K<sup>d</sup> を発現していることは, MHA assay および FACS を用いて確認しており, この MN-RenCa を BALB/c マウスに移植することで, 免疫機能に異常のない MN/CA9 抗原陽性ヒト腎細胞癌モデルを作製でき, これを用いて治療実験が可能となった。

MN/CA9 抗原のアミノ酸配列中, BALB/c マウス H-2K<sup>d</sup> のアンカーモチーフを含む 3 カ所をペプチド合成した。このペプチドや MN-RenCa 細胞を, BALB/c マウスに免疫することで CTL を誘導する試みを現在行っている。

## 2) リコンビナント抗体の作成

近年組み換え技術の進歩によりマウス抗体とヒト抗体より成るキメラ抗体の作製, マウス抗体の超可変領域 (CDR) の移植によるヒト型化抗体, 抗体結合部位のみから成る single chain 抗体 (scFv) の作製などが行われており, マウス抗体の免疫原性の低下や, トキシンとの融合蛋白としてのイムノトキシンの作製など, 目的に適合した抗体の作製が試みられている<sup>23)</sup>

Oosterwijk らは, MN/CA9 抗体を特異的に認識する G250 抗体をキメラ化し, <sup>131</sup>I 標識抗体による画像診断および治療を目的とした phase I/II 実験を実施し, 診断面での有効性を報告している。また問題点として, 血小板減少が認められること, さらにキメラ化によりマウス抗体としての免疫原性を低下させることには成功したが, 抗マウスヒト型抗体 (HAMA) の産生が認められることを報告している<sup>24)</sup>。

この問題点を克服するために G250 抗体の single chain 抗体 (scFv) の作製を試みている。scFv の利点として不変部分がないため免疫原性が低い, 腎臓とその他の標的器官での残留が少ない, 分子量が小さいために腫瘍への浸透効率が高い。抗体の結合能を改善できる, 様々な修飾が可能であるなどがあげられる。そ

してこの scFv 応用としては, scFv による免疫シンチグラム, scFv を用いたイムノリボソームによる遺伝子治療, 細胞障害物質との融合 scFv による腫瘍の治療, scFv 発現ベクターによる遺伝子治療,  $\zeta$  型 T 細胞レセプター (TCR) と scFv との融合, TCR 発現 T 細胞の CTL への応用などがあげられる。

## 結 語

腎細胞癌における MN/CA9 の役割について, 発癌と転移, さらに臨床応用について概説した。MN/CA9 発現には promoter 領域の低メチル化が示唆され, また VHL 遺伝子異常との関係についてはさらなる検討が必要である。MN/CA9 蛋白の機能については充分解明されていないが, 低酸素状態との関係も示唆されていることから, 発癌と転移において重要な役割を果たすものと考えられた。また, MN/CA9 は腎細胞癌に高頻度で発現することから, 診断や治療における標的分子として重要であると考えられた。

本稿を書くに当たり, 貴重な臨床資料を提供いただいた関連病院の諸先生方と研究に御協力いただいた研究室スタッフに深謝いたします。

## 文 献

- 1) Ritche AWS and deKernion JB: The natural history and clinical features of renal carcinoma. *Semin Nephrol* **7**: 131-139, 1987
- 2) Postrek J, Pastoreková S, Callebaut I, et al.: Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene* **9**: 2877-2888, 1994
- 3) Opavsky R, Pastorekova S, Zelnik V, et al.: Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics* **33**: 480-487, 1996
- 4) Nakagawa Y, Uemura H, Hirao Y, et al.: Radiation hybrid mapping of the human MN/CA9 locus to chromosome band 9p12-p13. *Genomics* **53**: 118-119, 1998
- 5) Oosterwijk E, Ruiter DJ, Hoedemaeker PhJ, et al.: Monoclonal antibody G250 recognizes a determinant present in renal-cell carcinoma and absent from normal kidney. *Int J Cancer* **38**: 489-494, 1986
- 6) Uemura H, Nakagawa Y, Yoshida K, et al.: MN/CA IX/G250 as a potential target for immunotherapy of renal cell carcinomas. *Br J Cancer* **81**: 741-746, 1999
- 7) Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, et al.: Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane car-

- bonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* **158**: 905-919, 2001
- 8) Pastoreková S, Parkkila S, Parkkila AK, et al.: Carbonic anhydrase IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology* **112**: 398-408, 1997
  - 9) Cho M, Grabmair K, Kitahori Y, et al.: Activation of the MN/CA9 gene is associated with hypomethylation in human renal cell carcinoma cell lines. *Mol Carcinog* **27**: 184-189, 2000
  - 10) Zbar B, Brauch H, Talmadge C, et al.: Loss of alleles of loci on short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature* **327**: 721-724, 1987
  - 11) Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al.: The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**: 271-275, 1999
  - 12) Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, et al.: Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* **60**: 7075-7083, 2000
  - 13) Ivanov SV, Kuzmin I, Wei MH, et al.: Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12596-12601, 1998
  - 14) Velickovic M, Delahunt B, Störkel S, et al.: VHL and FHIT locus loss of heterozygosity is common in all renal cancer morphotypes but differs in pattern and prognostic significance. *Cancer Res* **61**: 4815-4819, 2001
  - 15) Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, et al.: Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am J Pathol* **153**: 279-285, 1998
  - 16) Nakagawa Y, Tsumatani K, Kurumatani N, et al.: Prognostic value of nm23 protein expression in renal cell carcinomas. *Oncology* **55**: 370-376, 1998
  - 17) Závada J, Zavadová J, Machon O, et al.: Transient transformation of mammalian cells by MN protein, a tumor-associated cell adhesion molecule with carbonic anhydrase activity. *Int J Cancer* **10**: 857-863, 1997
  - 18) Závada J, Zavadová Z, Posterek J, et al.: Human tumor-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *Br J Cancer* **82**: 1808-1813, 2000
  - 19) Parkkila S, Rajaniemi H, Parkkila A, et al.: Carbonic anhydrase inhibitor suppresses invasion of renal cell cancer cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 2220-2224, 2000
  - 20) 植村天受: 腎細胞癌における高感度 RT-PCR 法を用いた患者血液中ガン細胞の検出. *泌尿紀要* **45**: 571-575, 1999
  - 21) 山名秀明, 伊藤恭悟: 癌ワクチン. *癌と治療* **27**: 1477-1488, 2000
  - 22) Shintaku I, Kawagoe N, Yutani S, et al.: Expression of the SART1 tumor rejection antigen in renal cell carcinoma. *Urol Res* **28**: 178-184, 2000
  - 23) Kawagoe N, Shintaku I, Yutani S, et al.: Expression of the SART3 tumor rejection antigen in renal cell carcinoma. *J Urol* **164**: 2090-2095, 2000
  - 24) 吉川和宏, 吉田 純, 中屋敷典久: 抗体の分子生物学. *脳神経外科* **26**: 758-767, 1998

(Received on September 18, 2001)  
(Accepted on September 18, 2001)